

学位論文題名

食道粘膜内癌における腫瘍増殖能, 浸潤能,
および宿主免疫応答についての免疫組織学的検討

学位論文内容の要旨

【緒言】

食道粘膜内癌の癌深達度は **m1**=粘膜上皮内にとどまるもの, **m2**=粘膜固有層に浸潤するもの, **m3**=粘膜筋板に浸潤するものに分類されているが, これまでの食道扁平上皮癌に関する検討より, 癌深達度が **m2** までにとどまるものには転移はほとんど認められないこと, 一方, **m3** 癌では 10~15%程度の症例に転移を伴うことが明らかとなっている. このように同じ粘膜内癌でもわずかな深達度の違いで転移の危険性は大きく変わってくるわけであるが, 実際にリンパ管や静脈などの脈管は粘膜筋板よりもむしろ粘膜固有層において豊富であり, 前述の転移率の違いが, 単に **m2** と **m3** という深達度のわずかな違いのみで説明付けられるかは疑問である. むしろ腫瘍自体の増殖能, 浸潤能, あるいは宿主免疫応答などが関わっている可能性があると思われる.

これまでに, **Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)**は様々な腫瘍の細胞増殖能の指標として有用であることが報告されてきた. **Matrix metalloproteinase-7 (MMP-7)**は腫瘍の浸潤・転移に重要な役割を担っていることが明らかとなっている. 腫瘍あるいは腫瘍間質に浸潤する **CD8** 陽性 T 細胞や **CD68** 陽性マクロファージは, 癌細胞に対する宿主免疫反応の表れであると考えられている. 今回本研究では, 食道 **m2** 癌と **m3** 癌の間に, 深達度以外に腫瘍としての性格に差異がないか, これらについて免疫組織学的検討を行った.

【対象と方法】

1. 対象

2001 年 5 月から 2007 年 1 月までの間に, 当診療部において内視鏡的粘膜切除術が施行された食道扁平上皮癌のうち, 病理組織学的に主病変の癌深達度が **m2** または **m3** と診断された連続した 49 例 (**m2** 癌=28 例, **m3** 癌=21 例) について **m2** 群と **m3** 群に分けて検討した.

2. 検討項目

対象症例の臨床病理学的因子として, 年齢, 性別, 腫瘍局在, 腫瘍長径, 脈管侵襲について検討した. 腫瘍増殖能の指標として腫瘍先進部における **PCNA** 標識率を, 転移・浸潤能の指標として腫瘍先進部における **MMP-7** 標識率を, 宿主免疫応答の指標として腫瘍先進部付近の **CD8** 陽性 T 細胞, および **CD68** 陽性マクロファージ数を免疫組織学的に検討した.

3. 免疫組織化学染色

腫瘍先進部を含むホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックから, それぞれの免疫組織化学染色用に新たに 4 μ m ずつ薄切して検体組織スライドを作製した. 染色操作は **Dako ChemMate ENVISION** キット/**HRP(DAB)**を使用して用手法にて行った. 一次抗体は抗ヒト **PCNA** マウスモノクローナル抗体 (**PC10**), 抗ヒト **MMP-7** マウスモノクローナル抗体 (**141-7B2**), 抗ヒト **CD8** マウスモノクローナル抗体 (**C8/144B**), 抗ヒト **CD68** マウスモノクローナル抗体 (**PG-M1**) を使用した.

染色された各標本は, 光学顕微鏡を用いて観察・評価した. **PCNA** および **MMP-7** につ

いては腫瘍先進部における標識率（染色された癌細胞数／すべての癌細胞数：％表示）を計測した。CD8 陽性 T 細胞および CD68 陽性マクロファージについては、腫瘍先進部と深部方向で接する間質の強拡大（400 倍）3 視野内に含まれるそれぞれの細胞数を計測した。

4. 統計学的解析

臨床病理学的因子の群間の比較には t 検定、分割表の分析には χ^2 乗検定を行った。PCNA および MMP-7 標識率、CD8 陽性 T 細胞および CD68 陽性マクロファージ数の群間の比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。いずれの方法も $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

【結果】

1. 除外症例

免疫染色用に検体ブロックから新たに 4 枚ずつ切り出した過程で、腫瘍浸潤部が不明瞭となった症例は除外した。4 枚全てで腫瘍浸潤部が明瞭であった 39 例（m2 癌=23 例，m3 癌=16 例）について検討した。

2. 臨床病理学的因子

年齢は m2 群が 66.8 ± 9.7 歳，m3 群が 66.1 ± 6.3 歳であった。性別は m2 群が男性 21 人，女性 2 人，m3 群が男性 14 人，女性 2 人であった。腫瘍局在は m2 群において頸部食道（Ce）-胸部上部食道（Ut）が 2 人，胸部中部食道（Mt）が 12 人，胸部下部食道（Lt）-腹部食道（Ae）が 9 人，m3 群において Ce-Ut が 3 人，Mt が 9 人，Lt-Ae が 4 人であった。腫瘍長径は m2 群が 26.8 ± 10.5 mm，m3 群が 20.8 ± 11.2 mm であった。脈管侵襲は m2 群では 1 例で，m3 群では 5 例で認められた。いずれの因子も両群間で有意差を認めなかった。

3. PCNA および MMP-7 標識率

腫瘍先進部における PCNA 標識率は m2 群で $78.3 \pm 16.8\%$ ，m3 群で $85.0 \pm 16.4\%$ であり，両群間に有意差を認めなかった。腫瘍先進部における MMP-7 標識率は m2 群で $1.1 \pm 4.3\%$ ，m3 群で $8.1 \pm 18.8\%$ であり，両群間に有意差を認めなかった。

4. CD8 陽性 T 細胞および CD68 陽性マクロファージ数

腫瘍先進部付近における CD8 陽性 T 細胞数は，m2 群で 257 ± 179 個，m3 群で 142 ± 112 個であり，m2 群では m3 群に比べて有意に多かった。腫瘍先進部付近における CD68 陽性マクロファージ数は，m2 群で 67.7 ± 38.9 個，m3 群で 43.0 ± 22.9 個であり，m2 群では m3 群に比べて有意に多かった。

【考察】

m2 群と m3 群の間で腫瘍先進部における PCNA 標識率に有意差を認めなかった。この結果から粘膜内癌の段階では両群の増殖能は同程度である可能性が示唆されたが，Ki67 等の PCNA 以外の腫瘍増殖能の指標については今回検討しておらず，今後さらなる検討が必要であると考えられる。

腫瘍先進部における MMP-7 の標識率についても両群間で有意差を認めなかった。この結果は，粘膜内癌の段階では腫瘍自体の浸潤能は m2 癌と m3 癌で同程度に低い可能性を示唆するものであるが，腫瘍の浸潤に関与する因子は多様であり，他の MMP family 等も含めて今後さらなる検討が必要であると思われる。

m2 群では m3 群と比べて腫瘍先進部付近において CD8 陽性 T 細胞および CD68 陽性マクロファージが多く認められた。癌に対する免疫応答には CD8 陽性 T 細胞やマクロファージの他にも，CD4 陽性 T 細胞，制御性 T 細胞，NK 細胞，樹状細胞など，様々な免疫細胞が複雑にかかわっているといわれている。今回は CD8 陽性 T 細胞および CD68 陽性マクロファージのみの検討であるが，m2 癌では m3 癌より宿主免疫応答が高まっている可能性が推測された。粘膜固有層から粘膜筋板に浸潤した段階で免疫応答が弱まる原因は不明であり，可能性としては制御性 T 細胞などによる免疫寛容の関与，あるいは炎症細胞が遊走する環境として，粘膜筋板や粘膜下層よりも粘膜固有層の方が適していることが考えられるが，このことについてはさらなる研究が必要であると思われる。

【結語】

食道粘膜内癌 m2 群と m3 群との間で腫瘍先進部における PCNA および MMP-7 標識率に差がなかったが，m2 群では m3 群と比べて腫瘍先進部付近において CD8 陽性 T 細胞お

よび CD68 陽性マクロファージが多く認められた。このことから腫瘍に対する宿主免疫応答の差異が m2 癌と m3 癌の悪性度の違いの一因である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 松 野 吉 宏

学 位 論 文 題 名

食道粘膜内癌における腫瘍増殖能，浸潤能， および宿主免疫応答についての免疫組織学的検討

これまでの食道扁平上皮癌に関する検討より、癌深達度が m2 までにとどまるものには転移はほとんど認められないこと、一方、m3 癌では 10～15%程度の症例に転移を伴うことが明らかとなっている。このように同じ粘膜内癌でもわずかな深達度の違いで転移の危険性は大きく変わってくるわけであるが、実際にリンパ管や静脈などの脈管は粘膜筋板よりもむしろ粘膜固有層において豊富であり、前述の転移率の違いが、単に m2 と m3 という深達度のわずかな違いのみで説明付けられるかは疑問である。むしろ腫瘍自体の増殖能、浸潤能、あるいは宿主免疫応答などが関わっている可能性があると思われ、これらについて免疫組織学的検討を行った。2001 年 5 月から 2007 年 1 月までの間に、北海道大学病院において内視鏡的粘膜切除術が施行された食道扁平上皮癌のうち、病理組織学的に癌深達度が m2 または m3 と診断された連続した 49 例（m2 癌=28 例、m3 癌=21 例）について m2 群と m3 群に分けて検討した。対象症例の臨床病理学的因子として、年齢、性別、腫瘍局在、腫瘍長径、脈管侵襲について検討した。腫瘍増殖能の指標として腫瘍先進部における PCNA 標識率を、浸潤能の指標として腫瘍先進部における MMP-7 標識率を、宿主免疫応答の指標として腫瘍先進部付近の CD8 陽性 T 細胞、および CD68 陽性マクロファージ数を免疫組織学的に検討した。免疫染色用に検体ブロックから新たに 4 枚ずつ切り出した過程で、腫瘍浸潤部が不明瞭となった症例は除外した。4 枚全てで腫瘍浸潤部が明瞭であった 39 例（m2 癌=23 例、m3 癌=16 例）について検討した。臨床病理学的因子については、m2 群と m3 群の間で、年齢、性別、腫瘍局在、腫瘍長径、脈管侵襲いずれの因子も有意差を認めなかった。腫瘍先進部における PCNA 標識率および MMP-7 標識率は両群間で有意差を認めなかった。腫瘍先進部付近における CD8 陽性 T 細胞数および CD68 陽性マクロファージ数は、m2 群において m3 群と比べて有意に多かった。以上より、m2 癌先進部では m3 癌先進部より免疫応答が高まっていると推測され、このことが m2 癌と m3 癌の悪性度の違いの一因である可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の松野教授から①数ある抗原の中で 4 種類の抗原を選択した根拠、

②他の免疫細胞の多寡、③m3 群の症例における粘膜固有層部分での免疫細胞数についての質問があった。申請者は①材料として浸潤部が限られているため、まずは過去に特に食道癌での報告例が多かった4種類での検討を行ったこと、②他の免疫細胞については今回検討していないが、細胞総数としてはm2 癌の方が多かった印象であること、また過去にm2 癌でm3 癌よりリンパ球総数が多かったとの報告があること、③m3 症例の粘膜固有層部分には粘膜筋板部分より多くの細胞を認める印象があり、m3 症例では粘膜筋板に浸潤した部分でのみ免疫応答が弱まっていると推測していること、また粘膜筋板は粘膜固有層に比べて、細胞が遊走しにくい環境である可能性があると回答した。次いで副査の近藤教授から①リンパ節転移を認める症例での検討結果、②今後の研究展望についての質問があった。申請者は①今回の症例数ではリンパ節転移を認める症例数は少なく、認めない症例と比較検討できる段階でなかったこと、②腫瘍増殖能としてKi67、浸潤能として他のMMP family、免疫応答の指標としてCD4 やNK 細胞、樹状細胞、制御性T 細胞等、材料の許す範囲で検討したいと思っていること、また、症例を蓄積しリンパ節転移の有／無での2 群間で比較して差が出るようなものがあれば、内視鏡的治療後にそれを免疫染色することによってリンパ節転移を予測し、追加治療の必要性を検討できるようになると回答した。さらに主査の浅香教授より食道癌の深達度診断法について質問があり、申請者は通常内視鏡に加えて色素内視鏡、拡大内視鏡、超音波内視鏡、X 線造影等があり、それぞれ一定の診断的メリットがあるが、沢山の症例を経験した術者の眼が非常に重要であると回答した。最後に本邦と海外における深達度分類の違いについて発言した。

本研究は、食道粘膜内癌のm2 癌とm3 癌の臨床像の違いに関して、腫瘍増殖能、浸潤能、宿主免疫応答の関わりについての知見が得られた点で高く評価され、これを足がかりとして癌進展のメカニズムの実態解明や、食道癌の内視鏡的治療後のリンパ節転移予測等へ結びつくことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。